

⑩ 日本国特許庁 (JP)  
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭58—128322

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 35/80  
// A 61 K 37/02

識別記号  
ADU

庁内整理番号  
7138—4C  
7138—4C

⑬ 公開 昭和58年(1983)7月30日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 制癌剤

② 特 願 昭57—11116

② 出 願 昭57(1982)1月27日

⑦ 発 明 者 新保國弘

流山市こうのす台629の23

⑦ 発 明 者 西土井睦

新座市野寺2の5の2

⑪ 出 願 人 クロレラ工業株式会社

東京都港区芝大門2の4の6 豊  
国ビル5F

⑭ 代 理 人 弁理士 鈴江武彦 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

制癌剤

2. 特許請求の範囲

クロレラ、セネデスムス、スピルリナ等の緑色微細藻類から分離された糖蛋白であって、分子量121,000、等電点(pH)8.6、糖蛋白比約1:1、蛋白のヘリックス含量約19%の特性を有する制癌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明はクロレラ、セネデスムス、スピルリナ等の緑色微細藻類から抽出された制癌剤に関する。

従来の糖蛋白系抗腫瘍剤は全て宿主介在性(免疫賦活作用)の機能を有している。このため、Invivoでは抗腫瘍性を示すが、Invitroでは直接的殺細胞作用を示さない。

このようなことから、本発明者はクロレラ等の緑色微細藻類の研究過程において該藻類に含まれるある種の成分に制癌作用があることを究

明し、これに基づきその成分について鋭意研究した結果が、特定の分子量、等電点、糖蛋白比及び蛋白のヘリックス含量を有する糖蛋白成分がInvivoとInvitroの両方に抗腫瘍性作用を示し、腫瘍細胞のみに特異的に作用して正常細胞への影響のない極めて優れた制癌作用を発揮することを見出したものである。つまり、本発明の制癌剤は腫瘍細胞に直接的な作用を示すにもかかわらず、正常細胞に対しては効かず、今日の化学療法剤で最大の問題になっている非選択毒性を解決した画期的な抗腫瘍剤である。

即ち、本発明はクロレラ、セネデスムス、スピルリナ等の緑色微細藻類から分離された糖蛋白であって、分子量121,000、等電点(pH)8.6、糖蛋白比約1:1蛋白のヘリックス含量約19%の特性を有するものである。

次に本発明の制癌剤をクロレラから分離する方法の一実施例を以下に述べる。

炭酸ガス、酢酸、グルコース等を炭酸源として培養されたクロレラ生ケーキあるいは、この

生ケーキを噴霧乾燥又は凍結乾燥して得たクロレラ藻体(粉末)を原料として用意する。クロレラ藻体500g(クロレラ生ケーキの場合は、5L)を水5Lに分散させ、95~100℃で、20~30分間熱水抽出した後、3,000~10,000 rpmで20~30分間遠心分離し、その上清をクロレラ熱水抽出物とした。この抽出に用いる溶媒は、熱水に限定せず、希酸、又は希アルカリを含有する水でも何ら支障はない。

この操作により、クロレラ藻体500gから熱水抽出物を約75g(粉末換算)を得た。熱水抽出物を、50℃で減圧濃縮し、全容量を蒸留水を加えて1Lにする。

これを半透膜に通し、半透膜を通過しない高分子画分(以下A画分と称す)と半透膜を通過した低分子画分(以下B画分と称す)とに分画した。A、Bの収量はそれぞれ45g(粉末換算)、30g(粉末換算)であった。さらに得られたA画分を500mlに減圧濃縮した後、DEAE-セルロースカラムに加え、緩衝液を段階

-3-

的に変化させながら多段階溶出を行った。

即ち、M/50炭酸緩衝液で溶出される画分をA<sub>1</sub>、M/10食塩を含むM/50炭酸緩衝液で溶出される画分をA<sub>2</sub>、そして1M食塩を含むM/50炭酸緩衝液で溶出される画分をA<sub>3</sub>とそれぞれ命名した。

A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>の収量はそれぞれ13.0g(粉末換算)、5.5g(粉末換算)、1.0g(粉末換算)であった。

A<sub>1</sub>画分を、50℃で減圧濃縮した後、透析膜で脱塩後、Sephadex G-150カラムに通液し、M/15リン酸緩衝液(pH 7.17)を用いて分画を行ない、得られた画分を透析し、更に凍結乾燥した。収量は140mg(クロレラ藻体の約0.025%)であった。

上記抽出方法で得られた物質の特性を以下に列挙する。

#### 〔i〕分子量

①電気泳動に分子量(計算値)128,000

②分析用超速心機(日立製; 吸収走査記録

-4-

装置282-0060型)による分子量121,000

上記①、②から分子量が121,000であった。

#### 〔ii〕純度

①ゲル透過法

②分析用超速心機の沈降パターン

③SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に

より純品であることが確認された。

#### 〔iii〕等電点

pH 8.6

#### 〔iv〕構成糖

得られた物質を100℃の塩酸中で3時間加水分解し、薄相、戸紙クロマトグラフィーとセルロースカラムクロマトグラフィーによって分離し、オルシノール硫酸法によって成分と量の分析を行なった。その結果を下記第1表に示す。

第 1 表

構 成 糖	量 (%)
ガラクトース	15.6
グルコース	23.4
マンノース	17.9
ラムノース	16.4
リボース	18.7
キシロース	8.0

#### 〔v〕構成アミノ酸残基

自動アミノ酸分析器(日立製; KLA-3B型)

によりアミノ酸の成分と量を分析した。その結果を下記第2表に示す。

第 2 表

構成アミノ酸残基	量 (%)	構成アミノ酸残基	量 (%)
リジン	6.4	アラニン	9.5
ヒスチジン	0.9	シスチン	—
アルギニン	4.9	バリン	6.9
アスパラギン酸	11.0	メチオニン	0.2
スレオニン	5.9	イソロイシン	3.9
セリン	5.2	ロイシン	7.9
グルタミン酸	19.5	チロシン	3.1
プロリン	4.6	フェニルアラニン	3.6
グリシン	6.5		

## 〔vi〕糖と蛋白質の構成比

490  $\mu\text{g}/\text{mg}$  : 510  $\mu\text{g}/\text{mg}$  (約 1 : 1)

## 〔vii〕赤外線分光分析

赤外線分光分析器 (日立製; Model 260-10 型) ( $\text{IR } \tau_{\text{max}}^{\text{kBr}} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) により結晶状態を調べた。

その結果、1640、1550 及び 1260 nm に  $\alpha$ -ヘリックスのアミド (I)、(II) 及び (III) の

-7-

よって消失したことにより確認された。

また、1663 nm にはランダムコイル構造のアミド (I) のバンド、1257 nm には重水素交換で消失したランダムコイル構造のアミド (III) のバンドに帰属する吸収が夫々あった。

更に、556 nm 又は 528 nm の 1 つの吸収と 379 nm とは夫々対称種 A 又は  $E_1$  の重なりと、アミド (IV) バンドの変角モードを示し、350 nm では疎水性アミノ酸による  $\alpha$ -ヘリックス構造の比較的分子量の大きい環の呼吸振動を示した。

上記〔vii〕、〔viii〕から得られた物質は結晶状でも溶液状でも  $\alpha$ -ヘリックス構造を保持している。

## 〔ix〕円二色スペクトル (CDカーブ)

旋光分散分光器 (日立製; UV-5 型) (CD 水溶液 pH 7.0) により  $\alpha$ -ヘリックスの含有量を調べた。

その結果、CDカーブは 200 nm にクロス

-9-

バンドに帰属される吸収が認められ、かつ 1660、1530 及び 1240 nm にはランダムコイル構造が認められた。

また、870 nm には  $\alpha$ -グルカンの  $C_1$ -位の equatorial の H の変角振動が、880 nm には pyranose 環の呼吸振動が、906 nm には  $\beta$ -グルカンの  $C_1$ -位の axial の H の変角振動が、910 と 920 nm にはこれら pyranose 環の C-O-C に関する非対称変角振動が、更に 999 nm には  $\beta$ -グルカンの特性吸収が、夫々認められた。

## 〔viii〕アルゴンレーザラマン分光分析

アルゴンレーザラマン分光分析器 (日本電子製; JRS-V1-UV) ( $\tau_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}(\text{D}_2\text{O})} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) により溶液状における構造を調べた。

その結果、1642 nm に  $\alpha$ -ヘリックスのアミド (I)、1309 nm ( $E_2$  対称種)、1294 nm ( $E_1$  対称種) 及び 1275 nm (A 対称種) に夫々  $\alpha$ -ヘリックスのアミド (III) のバンドが認められ、後者は重水による重水素交換に

-8-

オーバーポイントを示し、209 nm では ( $\theta$ )-9500、222 nm では ( $\theta$ )-7590 にダブルミニマムを示した。これより、 $\alpha$ -ヘリックス含量は 18.9 % (約 19 %) であった。

構成アミノ酸残基より主要な疎水性アミノ酸群はアミノ酸残基中のほぼ 35 % に相当し、糖成分も考えれば 1 分子中のほぼ 20 % に当る。 $\alpha$ -ヘリックス構造が主として疎水性アミノ酸で構成されているとすれば、 $\alpha$ -ヘリックスは分子鎖の 1 乃至数ヶ所に局在すると考えられる。

上述して得られた物質の制糖作用は以下に示す実験により確認された。

## 実験例 1 (Invitro 試験)

## (1-1) 浮遊培養法による測定

マウスリンパ性白血病培養確立株 (L-1210/V<sub>C</sub>) の接種細胞数を  $5 \times 10^4$  cells/mp になるように培地に植え込んだ。なお、この培地は 10 % FCS を含む RPMI 1640 (GIBCO) に 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のストレプトマイシンと 100 unit/ml のペニシリンを添加して pH 7.0 に調整したものである。

-10-

次いで、上記培地を37℃、72時間 Suspension Culture 法で行ない、本物質を一定量づつ添加した各群及び無添加コントロール群を作った。これら群の培養後の細胞数を比較判定したところ、無添加コントロール群は100%の増殖率を示したのに対し本物質を添加した群のIC-50(50%増殖阻止濃度)は2 $\mu$ g/mlであった。

#### (1-2) 軟寒天培養法による測定

常法(Soft agar cloning 分析法)に従って本物質のL-1210/V/Cの増殖阻止濃度定量を行ったところ、IC-50は2 $\mu$ g/mlであった。  
実験例2〔In vivo 試験〕

#### (2-1) ギルコーマ180による試験

10<sup>6</sup>ヶのギルコーマ180を1群30匹として5週令のdd系マウスの腹腔内に移植し、移植24時間後から毎日1回、連続5日間本物質を10mg/kgの割合でマウスの腹腔内に投与し、常法に従ってマウスの生存日数比(本物質を投与しないマウスに対する比)を調べた。その結果

-11-

また、本物質を1日置き、合計6回に亘ってウサギにその耳静脈より5mg/kg投与した場合、並びに前記条件で投与した場合でも免疫学的電気泳動において正常なウサギと区別される沈降線は認められなかった。

このようなことから、本物質は抗原性が低く、つまり抗体価も低いことがわかる。しかも、本物質は溶血凝固反応も共に認められなかった。

延命比(T/C)は180%であった

#### (2-2) P-388による試験

10<sup>6</sup>ヶのマウスリンパ球白血病(P-388)を1群30匹の5週令のCDF<sub>1</sub>マウスの腹腔内に移植し、移植24時間後から毎日1回、連続5日間にわたって本物質をマウスの腹腔内に10mg/kg投与し、常法に従ってマウスの生存日数比(本物質を投与しないマウスとの比)を調べた。その結果、延命率(T/C)は160%であった。

#### (2-3) L-1210による試験

10<sup>5</sup>ヶのマウスリンパ球白血病L-1210を1群30匹の5週令のCDF<sub>1</sub>マウスの腹腔内に移植し、移植24時間後から毎日1回、連続5日間に亘って本物質をマウスの腹腔内に10mg/kg投与し、常法に従ってマウスの生存日数比を調べた。その結果、延命率(T/C)は145%であった。

#### 実験例3〔免疫学的試験等〕

ウサギに本物質をその耳静脈より33mg/kgを投与し、10日間後更に33mg/kgを投与したところ、アナフィラキス様所見は全く認められなかった。

-12-

## 手続補正書

57.5.12  
昭和 年 月 日

特許庁長官 島田 春樹 殿

### 1. 事件の表示

特願昭57-11116号

### 2. 発明の名称

制 癌 剤

### 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

クロレラ工業株式会社

### 4. 代理人

住所 東京都港区虎ノ門1丁目26番5号 第17森ビル  
〒105 電話 03(502)3181(大代表)

氏名 (5847) 弁護士 鈴 江 武 彦



### 5. 自発補正

### 6. 補正の対象

明細書

## 7. 補正の内容

- (1) 明細書中第4頁19行目において、「④電気泳動に分子置」とあるを「④電気泳動による分子置」と訂正する。
- (2) 明細書中第5頁7行目において、「純品」とあるを「単品」と訂正する。
- (3) 明細書中第6頁の第1表を下記の如く訂正する。

記

第 1 表

構 成 糖	量 ( % )
ガラクトース	1 6. 4
グルコース	2 5. 5
マンノース	1 7. 6
ラムノース	1 4. 0
リボース	2 0. 3
キシロース	6. 2

- (4) 明細書中第7頁の第2表を下記の如く訂正する。

記

第 2 表

構成アミノ酸残基	量 ( % )	構成アミノ酸残基	量 ( % )
リジン	6. 6	アラニン	1 0. 5
ヒスチジン	2. 3	シスチン	—
アルギニン	4. 2	バリン	7. 5
アスパラギン酸	1 3. 2	メチオニン	0. 1
スレオニン	6. 2	イソロイシン	4. 2
セリン	6. 0	ロイシン	8. 4
グルタミン酸	1 2. 6	チロシン	4. 2
プロリン	4. 5	フェニルアラニン	4. 0
グリシン	5. 5		